

論文内容の要旨

論文提出者氏名 谷川 成佑

論文題目

Inhibition of Gli2 suppresses tumorigenicity in glioblastoma stem cells

derived from a *de novo* murine brain cancer model

論文内容の要旨

膠芽腫は成人の原発性悪性脳腫瘍で最も頻度が高く、標準治療の治療成績が平均生存期間 14.6 カ月と極めて予後不良であり、初期治療後多くの症例が 1 年以内に再発を来す。近年、膠芽腫組織中ががん幹細胞の特性を示す膠芽腫幹細胞が存在し、放射線および薬物治療に対する抵抗性や浸潤に寄与することが報告されており、治療成績を改善させるためには膠芽腫幹細胞を標的する新規の治療法を確立することが重要であると考えられる。しかし、膠芽腫幹細胞を純化する普遍的手法は未だ確立しておらず、膠芽腫幹細胞を制御するシグナル伝達経路として Wnt 経路、Hedgehog (Hh) 経路、Notch 経路、低酸素応答シグナル等が明らかにされているものの、これらの相互関係には不明な点が多い。これまでに、Wnt 経路の下流標的遺伝子でありかつ活性化促進因子でもある幹細胞マーカー遺伝子 *Lgr5* の発現が、ヒト臨床検体由来膠芽腫幹細胞の維持に重要な役割を果たすこと、および不良な予後と相関することが報告されていたが、**Lgr5** 陽性膠芽腫幹細胞の特性については不明な点が多い。そこで本研究では、**Lgr5** 陽性膠芽腫幹細胞の特性解析と、これらを攻撃するために有用な新規治療標的分子を同定することを目的とした。

Lgr5 プロモーターに *GFP* 発現が制御される *Lgr5-EGFP-IRES-Cre-ERT2* ノックインマウス新生仔の脳室周囲に豊富に存在する正常神経幹細胞に、発がん促進性遺伝子 (*NRasG12V*, *shTP53*, *EGFRvIII*) および *Luciferase* 発現ベクターを、*Sleeping Beauty* トランスポゾンシステムを用いて生体内導入することにより、自発発症型膠芽腫マウスモデルを作製した。*Luciferase* 発光を指標に膠芽腫組織を摘出し、EGF および bFGF 含有無血清培地で維持するニューロスフェア法により膠芽腫幹細胞を樹立した。*GFP* 蛍光シグナルを指標にセルソーターを用いて、**Lgr5** 陽性細胞と陰性細胞を生細胞の状態で前向きに分取した。これらのスフェロイド形成能および生体内腫瘍形成能を比較したところ、**Lgr5** 陽性細胞においてスフェロイド形成能が有意に高く、また同系統マウスへの同所性移植においてより高い腫瘍形成能を示した。そこで、マイクロアレイ法を用いた網羅的発現解析により **Lgr5** 陽性細胞と陰性細胞を比較したところ、Hh 経路関連遺伝子 Gli2 や Ptch2、および Hh 経路下流標的遺伝子 Cyclin B1 等が、**Lgr5** 陽性細胞で高発現していることを見出した。そこで膠芽腫幹細胞に Smoothened アゴニスト (5nM) を作用させたと

ころ、DMSO 溶媒コントロールと比較して有意なスフェロイド形成能の増強と **Lgr5** 発現の誘導を認め、対照的に Hh 経路阻害剤 Cyclopamine (5-10μM) により有意な増殖抑制と **Lgr5** 発現の低下を認め、Hh 経路活性により **Lgr5** 発現が制御されることが示唆された。

次に、幹細胞制御に重要な役割を果たす Hh 経路のエフェクター転写因子である Gli2 に着目し、shRNA 発現レンチウイルスベクターを用いて Gli2 ノックダウン (Gli2-KD) を行った。その結果、non-target shRNA 対照群と比較し Gli2-KD により膠芽腫幹細胞における BrdU 陽性 S 期細胞割合の減少、Annexin-V 陽性 PI 陰性早期アポトーシス細胞割合の増加を認め、Transwell assay を用いて浸潤能を評価したところ浸潤能の有意な低下を認めた。さらに、Gli2-KD により、Hh 経路の主要な因子である Ptch1/2 および Gli1、Sufu、Smo 等の発現低下とともに、Wnt 経路関連因子 **Lgr5** および Dvl3 の発現低下を認めた。また、Gli 阻害剤 GANT61 処理 (5μM) により Hh 経路に関与する多数の因子とともに **Lgr5** の発現低下を認め、細胞増殖抑制、アポトーシス誘導も認めた。これらの結果から、本膠芽腫幹細胞モデルにおいて、Gli2 が Hh 経路と Wnt 経路間のクロストークに寄与し、高腫瘍形成能を保持する **Lgr5** 陽性細胞の制御に重要な役割を果たしていると考えられた。そこで、腫瘍形成能に及ぼす影響を検証するため、同系マウスへの同所性移植実験を行ったところ、対照細胞移植群と比較し、Gli2-KD 細胞移植群では *Luciferase* 発光強度および腫瘍体積の有意な減少を認め、Gli2-KD による腫瘍形成能の抑制が明らかとなった。

本研究で **Lgr5** 発現膠芽腫幹細胞において Gli2 の発現と関連した高度な細胞増殖能および腫瘍形成能を示し、Gli2 を阻害することによりスフェロイド形成能および腫瘍形成能が抑制されることを示した。これらの知見は膠芽腫幹細胞の維持に Gli2 が重要な役割を果たしていることを示しており、今後、新規治療標的因子となり得る可能性を見出した。